Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität
Halle-Wittenberg.
Direktor: Professor Dr. M. Kochmann.

19

Beitrag zur quantitativen Morphinbestimmung im biologischen Versuch.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

einer

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Martin Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Vorgelegt von

Marta-Meta Sapia
appr. Zahnärztin
aus
Mikultschütz O.-S.

HALLE-SAALE
Buchdruckerei C. F. Rode & Sohn
1934.

Referent: Dr. Kochmann
Korreferent: Geh.-Rat Professor Dr. Abderhalden

Schon Straub und Herrmann haben in ihrer ersten Mitteilung über den biologischen Nachweis von Morphin an der weißen Maus darauf hingewiesen, daß man aus der Dauer der Reaktion — S förmige Krümmung des über den Rücken erhobenen Schwanzes — gewisse Schlüsse auf die Menge des injizierten Alkaloids ziehen könne.

Maier hat in einer Arbeit aus unserem Institut auf Grund der Straub'schen Reaktion eine Methode zum quantitativen Nachweis des Morphins ausgearbeitet, die gestattet, noch Bruchteile eines Milligramms nachzuweisen. Er war dabei in folgender Weise vorgegangen: Reihen von je 10 männlichen weißen Mäusen erhielten 0,01 oder 0,02 usw. bis 0,06 mg Morph. hydrochl. subcutan injiziert. Während bei 0,06 mg alle Mäuse die charakteristische Schwanzhaltung aufwiesen, zeigten die mit geringeren Gaben behandelten Tiere nur zum Teil die Reaktion. Die Anzahl der reagierenden Tiere nahm mit der Steigerung der Gabe zu, und es konnte zwischen Gabengröße und Anzahl der Reaktionen eine annähernd lineare Funktion festgestellt werden. Wenn nun 10 nicht vorbehandelten Mäusen eine Morphinlösung von unbekannter Konzentration verabreicht wurde, so ließ sich aus der prozentischen Anzahl der reagierenden Tiere ein Schluß auf die Menge des injizierten Morphins ziehen. Die Dauer der Reaktion, die ebenfalls mit steigender Morphingabe zunimmt, wurde dazu verwendet, um annähernd zu bestimmen, in welcher Größenordnung sich die festzustellende Morphinmenge bewegt. Durch zweckmäßige Verdünnung wurde es erreicht, daß beim endgültigen Versuch die injizierte Menge sich in der Spanne von 0,01 bis 0,06 mg befand. Das Wesen dieses quantitativen Nachweises, den wir mit Erfolg zur Lösung verschiedener Fragen nicht nur forensischer, sondern auch pharmakologischer Art benutzten, besteht also darin, aus der Dauer der Reaktion einen ungefähren Rückschluß auf die Morphinmenge zu ziehen und aus der Anzahl der Reaktionen eine genaue Bestimmung des Alkaloids zu ermöglichen.

Straub, W. u. Herrmann O. Biochem. Zeitschr. Bd. 39, S. 216 1912.
Maier, L. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 161, S. 163 1931.

Diese von uns zuerst gefundenen Feststellungen hat Keil benutzt, um ebenfalls eine biologische Morphinbestimmung auszuarbeiten, die als eine Modifikation unserer Methode betrachtet werden muß. Die Methode Keils unterscheidet sich von der Unsrigen in zwei Punkten: Er nimmt die Eichung der Mäuse nicht an zehn unvorbehandelten Tieren vor, sondern er injiziert 100 Mäusen einen um den anderen Tag fallende Gaben des Morphins, stellt die Anzahl der Reaktionen und die Dauer nach jeder Gabe fest und bestimmt dann an 50 von diesen Tieren die Konzentration einer unbekannten Morphinlösung bezw. die Größe einer unbekannten Morphingabe. Er verwendet also immer die gleichen Mäuse und scheinbar eine größere Anzahl als wir. Wir sagen ausdrücklich scheinbar — denn in Wirklichkeit müssen wir auch mindestens 70 Mäuse für den Versuch verwenden.

Es versteht sich von selbst, daß die Ergebnisse eines biologischen Versuches um so genauer werden, je größer die Anzahl der verwendeten Tiere ist. Daß immer 100 Tiere für einen biologischen Versuch genommen werden müssen, wäre aber zweifellos eine nicht berechtigte Forderung. Aus praktischen Gründen wird es sich immer empfehlen, mit einer Mindestzahl von Tieren auszukommen, vorausgesetzt, daß die Sicherheit des Ergebnisses nicht gefährdet wird. So begnügt man sich ja zum Beispiel bei der Wertbestimmung der Digitalis oder des Ovarialhormones mit einer wesentlich geringeren Anzahl von Tieren, bei letzterer z. B. von 20 Tieren für jede Gabe. Wir glauben also, daß zwar die Anzahl der Tiere eine erhebliche Rolle spielt, daß aber aus Zweckmäßigkeitsgründen nicht zu große Anforderungen gestellt werden dürfen. Und schließlich hat sich ja auch Keil bei der endgültigen Einstellung unbekannter Morphindosen mit 50 Tieren begnügt.

Eine andere Frage ist die, ob es erlaubt ist, nach den Keil'schen Vorschriften immer die gleichen Tiere zu benutzen und ihnen während 11 Tagen 6 mal Morphin zu verabreichen. Man könnte sich gerade bei Morphin, das doch bekanntermaßen zur Angewöhnung führt, vorstellen, daß die Reaktionen, sowohl was Anzahl wie Dauer anbelangt, durch eine solche Vorbehandlung verändert werden.

Keil, W. u. Kluge, A. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. 174 S. 493 1934.

Um diese Frage zu entscheiden, haben wir folgende Versuche angestellt: 100 männlichen weißen Mäusen wurden steigende Morphinmengen subcutan unter die Rückenhaut injiziert, und zwar einen um den anderen Tag. Wir fingen mit 0,01 mg an und steigerten um 0,01 mg bis 0,06 mg des salzsauren Alkaloids. Die injizierte Flüssigkeitsmenge betrug regelmäßig 0,5 ccm/20 g Maus. Es wurde die Anzahl der Reaktionen und die Dauer festgestellt. Da die Schwanzhaltung, wie bekannt, nicht dauernd in der gleichen Stärke vorhanden ist, so wurde durch geringe akustische und Erschütterungsreize die Reaktion hervorgerufen oder ihr Erscheinen begünstigt. Wir vermieden aber mit Absicht ein Berühren der Tiere, weil nach unserer Auffassung auch durch vorsichtiges Kneifen z. B. die Eindeutigkeit der Reaktion gestört wird.

Nachdem bei 0,06 mg/20 g Tier alle Mäuse reagiert hatten, wurden wiederum einen über den anderen Tag steigende Mengen von 0,01 mg — 0,06 mg injiziert und die Reaktionen festgestellt. Im übrigen wurden die 100 Tiere nicht auf einmal behandelt, sondern es kamen aus äußeren Gründen Reihen von 50 Tieren zur Verwendung. Die Einzelheiten des Versuches lassen sich aus folgenden Tabellen entnehmen:

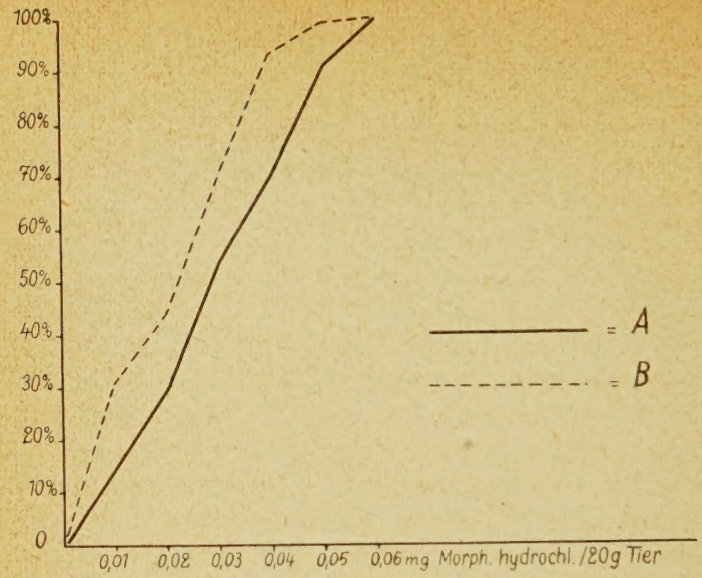
Gruppe I (50 Tiere)

	A = 1. Injektionsreihe				B = 2. Injektionsreihe			
mg Morph. hydrochl. 20 g Tier	Tier-reakt. in %	Zeitreakt. i. Min. Durchschnittswert	Zentralwert	%ische Streuungsbreite	Tier-reakt. in %	Zeitreakt. i. Min. Durchschnittswert	Zentralwert	%ische Streuungsbreite
0,01	20%	60′	65′	38%	30%	91′	100′	40%
0,02	30%	75′	70′	36%	46%	103′	100′	55%
0,03	58%	98′	98′	46%	72%	106′	107′	35%
0,04	70%	113′	110′	62%	92%	116′	120′	39%
0,05	92%	134′	134′	49%	98%	133′	130′	100%
0,06	100%	163′	160′	55%	100%	144′	145′	39%

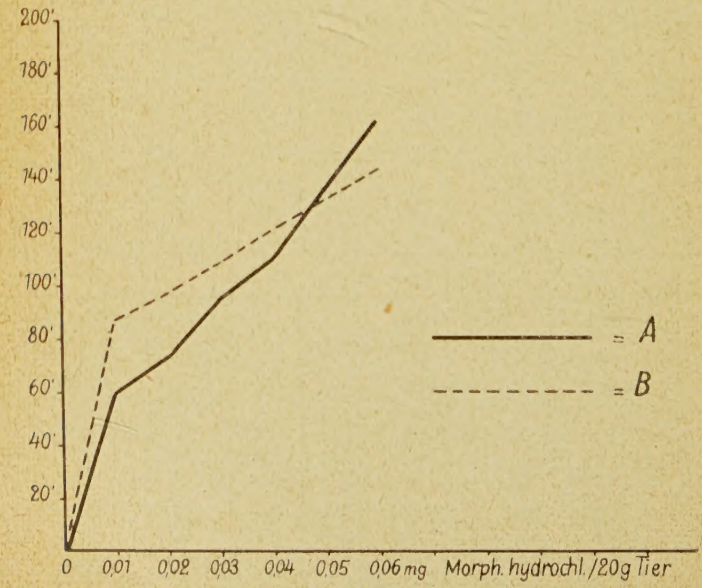
Gruppe II (50 Tiere)

	A = 1. Injektionsreihe				B = 2. Injektionsreihe			
mg Morph. hydrochl. 20 g Tier	Tier-reakt. in %	Zeitreakt. i. Min. Durchschnittswert	Zentralwert	%ische Streuungsbreite	Tier-reakt. in %	Zeitreakt. i. Min. Durchschnittswert	Zentralwert	%ische Streuungsbreite
0,01	10%	60′	60′	12%	32%	83′	80′	34%
0,02	30%	70′	70′	42%	40%	92′	93′	35%
0,03	50%	92′	95′	26%	68%	111′	120′	35%
0,04	70%	107′	110′	27%	92%	125′	130′	30%
0,05	90%	139′	145′	34%	100%	130′	135′	20%
0,06	100%	160′	160′	22%	100%	142′	145′	32%

Tierreaktion in % (100 Tiere)



Zeitreaktion in Minuten (Durchschnittswert. 100 Tiere)



Gruppe I und II (100 Tiere)

A = 1. Injektionsreihe					B = 2. Injektionsreihe			
mg Morph. hydrochl. 20 g Tier	Tier-reakt. in %	Zeitreakt. i. Min. Durchschnittswert	Zeitreakt. i. Min. Zentralwert	%ische Streuungsbreite	Tier-reakt. in %	Zeitreakt. i. Min. Durchschnittswert	Zeitreakt. i. Min. Zentralwert	%ische Streuungsbreite
0,01	15%	60′	65′	38%	31%	87′	90′	47%
0,02	30%	73′	70′	46%	44%	97′	100′	45%
0,03	54%	95′	100′	39%	70%	108′	111′	45%
0,04	70%	110′	110′	62%	93%	120′	125′	40%
0,05	91%	137′	140′	53%	99%	132′	130′	100%
0,06	100%	161′	160′	53%	100%	143′	145′	39%

Um die Ergebnisse übersichtlich zu gestalten, haben wir sie auch kurvenmäßig dargestellt. Es zeigt sich, daß die Kurven (100 Tiere) der 1. und 2. Injektionsreihe keineswegs miteinander übereinstimmen. Die prozentische Anzahl der reagierenden Tiere liegt in der zweiten Injektionsreihe oberhalb der ersten, d. h. also bei der zweiten Injektionsreihe reagieren mehr Tiere auf die gleiche Gabe als bei der ersten. Mithin ist es zu einer gewissen Empfindlichkeitssteigerung der Tiere durch die ersten Injektionen gekommen. Im übrigen sieht man, daß mit steigenden Gaben die Anzahl der Reaktionen proportional zunimmt und die Kurve darum linear ansteigt, das erste Mal etwas weniger steil als bei der zweiten Injektion von 0,01 — 0,06 mg.

Was die Dauer der Reaktionen anbelangt, so verläuft die Kurve nicht ganz geradlinig, sondern sie zeigt bei der ersten wie bei der zweiten Injektion einen kleinen Knick bei 0,01 und erst von da an ist sie annähernd geradlinig. Weiter ist es auffallend, daß die Kurve B von da aus flacher ist und schließlich gar bei 0,047 mg/20 g Tier die erste Kurve schneidet und bis 0,06 unterhalb der ersten verläuft.

Wir sehen also, daß die Morphinbehandlung zwar zu keiner Gewöhnung im üblichen Sinne geführt hat, wohl aber zu einer Aenderung der Reaktionsbereitschaft der Tiere, die bezüglich der Anzahl der Reaktionen eine Art Sensibilisierung bedeutet. Daß diese Veränderung nicht gleichgültig für die quantitative Bestimmung unbekannter Morphindosen ist, ergibt sich aus folgendem Versuch: Dem Versuchsansteller wurde eine Morphinlösung zur Einstellung gegeben, die in 0,5 ccm Lösung 0,025 mg Morph. hydrochl. enthielt. Die Konzentration dieser Lösung war dem Versuchsansteller nicht bekannt. Sie wurde 40 vorbehandelten

Mäusen injiziert. Da die Anzahl der Reaktionen 60% betrug, so mußte man aus dem Verlauf der ersten Injektionskurve auf 0,034 mg Morphin. HCl schließen. Unter Zugrundelegung der zweiten Injektionsreihe würden 0,026 mg Morphin in 0,5 ccm Lösung gewesen sein. Da die Vorbehandlung der Tiere schon 14 Tage zurücklag, so muß man daraus schließen, daß die Reaktionsveränderung noch nicht abgeklungen ist. Wäre man lediglich nach der Keil'schen Versuchsanordnung vorgegangen, so hätten wir statt 0,025 mg 0,034 mg Morphin gefunden — einen Wert — der um 36% zu hoch liegt. Wenn wir dagegen die Versuche anstellen, wie es Maier beschrieben hat, so würden wir 0,026 mg, also fast genau den richtigen Wert gefunden haben.

Wir glauben also, daß die in unserem Institut gebräuchliche Methode keine ungünstigeren Ergebnisse liefert als die von Keil, sondern daß sie einen höheren Grad der Genauigkeit aufweist.

Es sei bemerkt, daß die Tiere während der ganzen Versuchszeit keinerlei krankhafte Veränderungen aufwiesen, wenigstens war das Körpergewicht nicht vermindert, sondern sogar angestiegen.

Die Versuche sind aber noch aus einer anderen Fragestellung heraus unternommen worden, deren Beantwortung durch die Ergebnisse bis zu einem gewissen Grade möglich ist. Wenn wir die Schwanzreaktion als eine Erregungserscheinung ansehen, so würde sich aus den Ergebnissen der Schluß ableiten lassen — daß eine Angewöhnung der Erreguug nicht möglich ist; denn sonst hätte es ja zu einer „Verschlechterung" der Reaktion kommen müssen. Diese Tatsache spricht auch gegen die Auffassung, daß diese Erregungserscheinung auf eine Lähmung von Hemmungen zurückzuführen sei. In diesem Falle würde die Anzahl der Reaktionen bei den vorbehandelten Tieren ebenfalls erst durch größere Gaben zum Vorschein gekommen sein. In unseren Versuchen war aber gerade eine Sensibilisierung eingetreten, immerhin ein Beweis, daß eine Veränderung der Reaktionsbereitschaft der Zellen Platz gegriffen hat.

Die Versuche zeigen ferner, daß das Morphin nicht in erhöhtem Maße bei den vorbehandelten Tieren primär zerstört worden ist, sofern man die Anzahl der Reaktionen in Betracht zieht; denn sonst hätten diese auch in diesem Falle eine Verminderung erleiden müssen. Andererseits haben wir den Eindruck, daß sekundär das resorbierte Morphin wenigstens in den

höheren Graden über 0,047 mg / 20 g Tier bei den vorbehandelten Tieren schneller eliminiert worden ist; denn die Kurve der Reaktionsdauer bei der zweiten Injektion schneidet von 0,047 an die erste Kurve und bleibt von da aus unterhalb dieser zurück. — Es muß allerdings zugegeben werden, daß die Dauer der Reaktionen sehr große Streuung zeigt. Das geht aus den Zahlen hervor, die wir als Zentralwerte mit prozentischer Streuungsbreite angegeben haben. —

Dafür, daß die Reaktionszeit bei vorbehandelten Tieren abnimmt, spricht auch eine bisher noch nicht veröffentlichte Beobachtung Maier's in unserem Institut. Maier injizierte 10 Mäusen eine sehr erhebliche Menge, nämlich 0,25 mg Morph. hydrochl. in 0,5 ccm subcutan unter die Rückenhaut täglich einmal. Nach neunmaliger Injektion konnte er feststellen, daß selbstverständlich alle Mäuse mit der charakteristischen Schwanzhaltung reagierten, daß aber die Dauer der Reaktion um 28% der Zeit abgenommen hat. Die Einzelheiten eines solchen Versuches gehen aus folgender Tabelle hervor:

Injektion Nr.	Zeitreaktion in Minuten		
	Durchschnittswert	Zentralwert	
1	329′	330′	
2	314′	317′	
3	301′	304′	
4	307′	307′	Alle Tiere erhalten 0,25 mg
5	323′	320′	Morphin hydrochl. in
6	299′	320′	0,5 ccm Lösung subcutan.
7	243′	242′	
8	239′	240′	
9	237′	235′	

Die Dosis letalis liegt bei nicht vorbehandelten Tieren bei 6,5—7,5 mg Morphin, bei Tieren, welche 3 Wochen vorbehandelt sind, betrug die tödliche Dosis 10—14,5 mg / 20 g Tier, ein Beweis, daß eine Angewöhnung an toxische Dosen möglich ist.

Das Ergebnis dieses Versuches ist also ähnlich wie das der vorstehenden Versuche, wo ebenfalls 0,04 mg eine Verkürzung der Reaktionszeit hervorrief, was wir auf eine schnellere Zerstörung oder Ausscheidung des bereits wirksam gewesenen Morphins als wahrscheinlichste Erklärung angenommen haben.

Ob die festgestellte Sensibilisierung, die sich aus unseren Versuchen ergibt, ein Licht auf die Angewöhnung des Organismus an Morphin wirft, ist eine heikle Frage. Eine primäre Zerstörung des Morphins ist zweifellos nicht vorhanden. Aber auch für die Amsler'sche Ansicht von der Verschiebung der Wirkungsphasen des Morphins, Lähmung-Erregung, zu Gunsten der Erregung lassen sich keine sicheren Anhaltspunkte gewinnen. Man müßte sonst annehmen, daß dem Erscheinen der Schwanzreaktion ein nicht zu beobachtendes Lähmungsstadium vorausgeht, das bei den vorbehandelten Tieren abgekürzt worden wäre. Immerhin ist es nicht unmöglich, daß etwas derartiges vorhanden ist, selbst wenn es auch einer sorgfältigen Beobachtung entgeht.

Amsler, C. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 161 S. 233 1931.

Zusammenfassung.

1. Durch Vorbehandlung von weißen Mäusen mit steigenden Gaben von 0,01 — 0,06 mg Morphin in 0,5 ccm Lösung injiziert, wird eine nicht unerhebliche Erhöhung der Reaktionsbereitschaft erzielt, die sich in der prozentischen Erhöhung der Anzahl der Reaktionen ausspricht.

2. Die Reaktionsdauer wird bei den Gaben bis 0,047 mg ebenfalls verlängert, darüber hinaus allerdings verkürzt.

3. Die Mäuseschwanzreaktion läßt sich nicht angewöhnen.

4. Es wird aus den Versuchsergebnissen geschlossen, daß eine primäre Zerstörung des Morphins bei vorbehandelten Tieren nicht eintritt, daß aber möglicherweise bei den höheren Gaben eine sekundäre Beschleunigung der Elimination (Zerstörung oder Ausscheidung) vorhanden sein könnte, die zu einer Abkürzung der Reaktionsdauer führt.

5. Die Versuchsergebnisse sprechen nicht gegen die Amsler'sche Ansicht der Morphingewöhnung (Phasenverschiebung), wenn es auch nicht gelingt, die erste Phase — Lähmung — zu beobachten.

6. Die Keil'sche Modifikation unserer früheren, durch Maier veröffentlichten Versuchsanordnung, der zum ersten Male die prozentische Anzahl der reagierenden Tiere für die quantitative Morphinbestimmung im biologischen Versuch verwendete, scheint uns keinen Vorteil gegenüber der früheren Anordnung zu gewähren. Sie ist nach unserer Auffassung nicht genauer und ist zweifellos zeitraubender, da sie eine elftätige Vorbehandlung fordert, während sie in der Maier'schen Anordnung an einem Tage auszuführen ist.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, Herrn Professor Dr. Kochmann für die Ueberlassung der Arbeit und die stete Hilfsbereitschaft bei ihrer Ausführung an dieser Stelle meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

Lebenslauf.

Am 30. Dezember 1908 wurde ich, Marta-Meta Sapia, als Tochter des Bergverwalters Josef Sapia zu Mikultschütz O.-S. geboren. Ich besuchte ein Jahr lang die Volksschule zu Mikultschütz, 12 Jahre das Oberlyzeum der Armen Schulschwestern v. U. L. F. zu Beuthen O.-S., wo ich Ostern 1928 die Reifeprüfung bestand. Im Sommersemester 1928 begann ich an der Schles. Friedrich-Wilhelms-Universität Breslau das Studium der Zahnheilkunde und bestand daselbst am 27. April 1931 die Zahnärztliche Vorprüfung, nachdem ich vorher die Ergänzungsprüfung im Latein am Realgymnasium „Am Zwinger", Breslau abgelegt hatte. Darauf besuchte ich zwei Semester lang die Universität zu Marburg und vom Frühjahr 1932 bis August 1933 die Universität zu Halle, wo ich das zahnärztliche Staatsexamen ablegte. Mit dem 17. Januar 1934 wurde mir die Approbation als Zahnarzt erteilt.